

Ausscheidung von N-Acetyltryptophan bei
Leberinsuffizienz. Nachweis durch
eindimensionale Dünnschichtchromatographie

Christian Melzer

1981

Aus der I. Medizinischen Klinik und der Poliklinik
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

AUSSCHEIDUNG VON N-ACETYLTRYPTOPHAN BEI
LEBERINSUFFIZIENZ. NACHWEIS DURCH
EINDIMENSIONALE DÜNNSCICHTCHROMATOGRAPHIE

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Würde des Doktors der Medizin
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
dem Fachbereich Medizin

vorgelegt von
Christian Melzer
aus Dirmstein
Mainz, 1981

Dekan: Prof. Dr. H.-K. Baeßler

1. Gutachter: Prof. Dr. K. H. Holtermüller

2. Gutachter: Prof. Dr. K. Ewe

Tag der mündlichen Prüfung: 11. November 198



I N H A L T S G L I E D E R U N G

A Einleitung

- A1 Stoffwechsel des Tryptophans
- A2 Metaboliten des Tryptophan-Stoffwechsels als klin.-chem. Parameter und ihre Bedeutung
- A3 Bisherige Erkenntnisse über das Acetyl-Tryptophan bei bestimmten Krankheitsverläufen
- A4 Nachweisverfahren

B Fragestellung und Zielsetzung

C Material und Methodik

- C1 Krankengut und Kontrollgruppen
 - 1.1 Kasuistik
- C2 Verwendete Reagenzien, Apparate und deren Hersteller
- C3 Laufmittelgemisch, Sprühreagenzien und Standardlösung
- C4 Ursprünglich verwendete Methode
- C5 Optimierungsversuche zur Entwicklung einer Methode wie unter "Zielsetzung" beschrieben

D Ergebnisse

- D1 Vorschrift zum direkten Nachweis von Acetyl-Tryptophan im Harn ohne Extraktion
 - 1.1 Halbquantitative Auswertung
 - 1.2 Quantitative Auswertung
- D2 Acetyl-Tryptophan-Tagesausscheidung
 - 2.1 von Gesunden
 - 2.2 von Kranken

E Diskussion

E1 Kritik der eigenen Methode und Vorteile gegenüber
anderen Verfahren

E2 Bedeutung der Bestimmung der Tagesausscheidung in
der Diagnostik (Prognose) bei Leberinsuffizienz

F Schlußfolgerungen

G Zusammenfassung

H Literaturverzeichnis

A Einleitung

A1 Stoffwechsel des Tryptophans

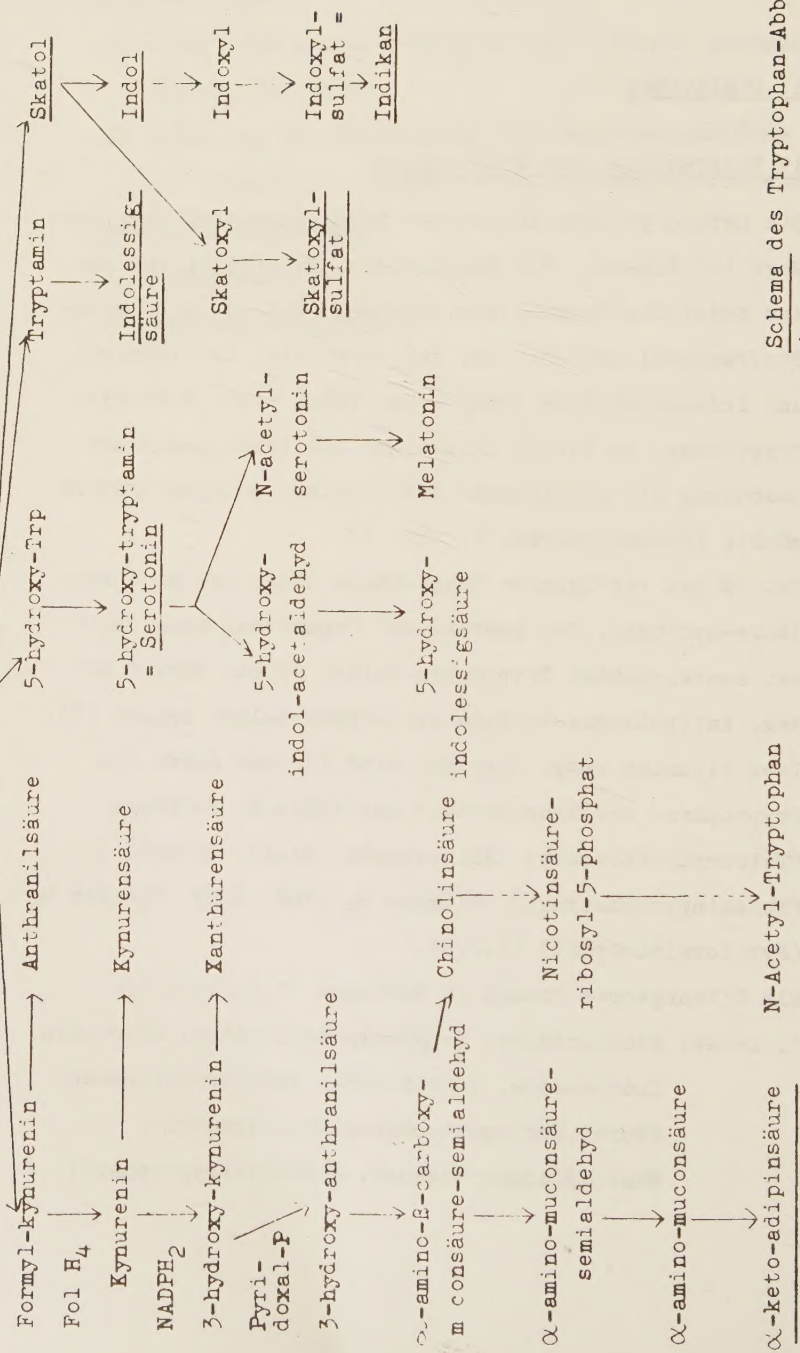
Die heterocyclische Aminosäure Tryptophan wird über zwei Wege (s. Schema), den Nicotinsäure-Ribonucleotid- und den Indol-Stoffwechselweg abgebaut (1,2,3). Der Indol-Stoffwechsel liefert u.a. das Serotonin, Indolessig- und Indolmilchsäure, Skatol und Indol sowie N-Acetyl-Tryptophan, zu dessen klinischer und laborchemischer Bedeutung die vorliegende Arbeit einen Beitrag liefern möchte (Strukturformel s. Abb. 1).

Ca. 1% des verfügbaren Tryptophans dient der Nicotinsäure-Synthese. Der menschliche Organismus kann damit bei ausreichender Tryptophan-Zufuhr seinen Bedarf am sog. Antipellagra-Vitamin weitgehend selbst decken (1). Vier Vitamine resp. Coenzyme sind für den Abbau des Tryptophans zur Nicotinsäure unerlässlich: Folsäure (Tetrahydrofolsäure), Nicotinamid (NADP), Vitamin B₁ (Thiaminpyrophosphat), Vitamin B₂ (FMN, FAD), Vitamin B₆ (Pyridoxalphosphat) (1,2,3).

Als Bildungsorte kommen in Betracht (1,2,3,4,5,6):

1. Leber: Nicotinsäure, 5-hydroxy-tryptophan, Serotonin, Indolessig-, Indolmilch-, Indolbrenztraubensäure, Konjugationsprodukte (Indoxyl-, Skatoxylschwefelsäure. N-Acetyltryptophan?)

TRYPTOPHAN N-Acetyltryptophan



Schema des Tryptophan-Abbaus
(in Anlehnung an E. Buddecke,
Grundriß der Biochemie)

2. Niere: Serotonin, Xanthurensäure
3. Gehirn: Serotonin
4. Chromaffine Zellen: Serotonin
5. Darmflora: Indol Skatol, Indolessig-, Indolmilch-,
Indolbrenztraubensäure, N-Acetyltryp-
tophan?

Durch die Konjugation mit Schwefelsäure in der Leber entstehen aus Skatoxyl und Indoxyl Skatoxyl- bzw. Indoxylsulfat (=Indikan) und werden in dieser Form mit dem Harn ausgeschieden (Harnindikan) (1,2,4).

II. Metaboliten des Tryptophan-Stoffwechsels als klinisch-chemische Parameter

Bei der als Hartnup-Krankheit bekannt gewordenen Tryptophan-resorptionsstörung werden Indolessigsäure, Indolmilch-säure, Indikan, α -N(indol- β acetyl)-glutamin neben Tryptophan vermehrt ausgeschieden (1,2,3,7,8,9,10). Der entstehende Nicotinsäuremangel ist für das Pellagra-Symptom verantwortlich.

Zwei 'inborn errors of metabolism' des Tryptophans sind bekannt, die Hypertryptophanämie und die 3-Hydroxykynureninurie (12,13,14). Diesen Stoffwechsel-anomalien liegt ein Mangel der Tryptophan-Pyrrolase bzw. Kynureninase zugrunde. Im ersten Fall wird

Tryptophan allein, im zweiten werden Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und Xanthurensäure vermehrt ausgeschieden. Die von Grosser (15) beschriebene Xanthurenurie ist wohl mit der 3-Hydroxykynureninurie identisch. Auch hier treten typische Pellagra-Symptome auf. Ein verändertes Ausscheidungsmuster von Tryptophan-Metaboliten findet sich auch bei der Phenylketonurie (PKU) (1,7,10). Neben der für die PKU charakteristischen vermehrten oder neu auftretenden Ausscheidung von Phenylalanin und seiner Stoffwechselprodukte kommt es auch zu einer verminderten Harnausscheidung von 5-Hydroxyindolessigsäure (1). Phenylalanin und Tryptophan werden durch das gleiche Enzym in der Leber hydroxyliert, wobei Phenylalanin selbst einen Inhibitor der Tryptophanhydroxylierung darstellt und damit den erniedrigten Serotoninspiegel im Blut und die verminderte Ausscheidung von 5-Hydroxyindolessigsäure erklärt (1). Hinzu kommen eine vermehrte Ausscheidung von Indolessig-, Indolmilchsäure, Tryptophan und eine auffallend hohe Indikan-Ausscheidung (7,8). Vitamin B₆-Mangelzustände können durch Tryptophan-Belastungstests und die anschließende quantitative Bestimmung der Xanthurensäureausscheidung diagnostiziert

werden (1). Neben der Xanthurensäure ist auch Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure und Chinolinsäure im Harn vermehrt, die beiden letztgenannten sind erhöht, weil die auf die Kynureninase-Reaktion folgende Umwandlung vermutlich auch Pyridoxalphosphat erfordert (13,16). Gleiche Tryptophan-Stoffwechselstörungen finden sich auch bei der Einnahme von Vitamin B₆-Antagonisten (INH, D-Penicillamin) (13). Der Tryptophanstoffwechsel unterliegt auch hormonellen Einflüssen. So führen Corticosteroide und Oestrogene zu einer Aktivitätszunahme der Tryptophan-Pyrrolase (13,17,18). Die Folge ist eine gesteigerte Ausscheidung von Kynurenin und anderen Intermediärstufen. Androgene bewirken das Gegenteil, eine Abnahme der Tryptophan-Pyrrolase-Aktivität. Diese Abhängigkeit des Tryptophan-Stoffwechsels von Hormonen zeigt sich in der Schwangerschaft, bei der Oestrogeneinnahme und bei hormon-aktiven Tumoren (13,19).

Auch bei den meisten Patienten mit Rheumatoider Arthritis (cP) findet sich eine vermehrte Ausscheidung von Tryptophan-Metaboliten, in erster Linie Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure (13).

Das metastasierende Karzinoid ist gekennzeichnet durch

eine vermehrte Ausscheidung von 5-Hydroxyindolessigsäure und einer fakultativ erhöhten Serotonin-Ausscheidung (7,10,20,21,22). Durch eine Bevorzugung des Indol- bzw. Serotonin-Stoffwechsels kommt es auch hier zu einer verminderten Nicotinsäure-Synthese.

Eine erhöhte Kynurenin-Konzentration im Harn findet sich beim M. Hodgkin (13,23) und bei ein bis zwei Drittel der übrigen Hämoblastosen.

Beim Blasenkarzinom und and. Tumoren des Urogenitaltraktes findet sich eine vermehrte Ausscheidung von Anthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilsäure, 3-Hydroxyanthranilschwefelsäureester, Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxykynureninschwefelsäureester (13,19,23,24).

Über die Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten bei Lebererkrankungen ist bisher nur wenig berichtet worden.

Armstrong (1958) (20) fand bei Leberinsuffizienz eine vermehrte Ausscheidung von Indolessigsäure und 5-Hydroxyindolessigsäure-sulfat.

Musajo (1964) (23) hat bei Virushepatitis Kynurenin und 3-Hydroxyanthranilsäure vermehrt gefunden, weniger häufig Anthranilsäure.

Hartmann (1962) (2) identifizierte in 51 pathologischen Harnen neben dem N-Acetyltryptophan elf Zwischen- und Endprodukte des Tryptophan-Stoffwechsels, einschließlich der dem bakteriellen Stoffwechsel des Darms entstammenden Indolderivat. Bei den nachgewiesenen Substanzen handelt es sich um :

Kynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure, Antranilsäure, 5-Hydroxytryptophan, Serotonin, 5-Hydroxyindoleessigsäure, Indoleessig- und Indolmilchsäure, Indol, Indoxylschwefelsäure (Indikan), Skatoxylschwefelsäure und N-Acetyltryptophan.

Mit Ausnahme der 3-Hydroxyanthranilsäure kommen die aufgezählten Substanzen auch bei Gesunden vor.

Bei chron. Hepatitis, Lebercirrhose, portaler Hypertension, Shunt-Operationen und Präcoma wurden 3-Indoleessigsäure, Indol und Indikan regelmäßig und 3-Indolmilchsäure nahezu regelmäßig ausgeschieden. 5-Hydroxyindoleessigsäure wurde bei den aufgezählten Lebererkrankungen seltener, beim Präcoma gleich häufig und bei allen aufgeführten pathologischen Zuständen vermindert gefunden (2,11). Analog dazu wird auch Serotonin seltener und vermindert ausgeschieden, jedoch findet sich zwischen dem Präcoma und den übrigen Leberleiden praktisch kein Unterschied. Nur in relativ wenig

Fällen von Gesunden und Leberkranken fand sich Ky-nurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure, Anthranilsäure, 5-Hydroxytryptophan und Skatoxylschwefelsäure.

III. Bisherige Erkenntnisse über das Acetyltryptophan
 Die Ausscheidung von Spuren von Acetyltryptophan mit dem Harn wurde zuerst nach Tryptophan-Belastung von Langner und Born 1955 (25) beschrieben. 1958 konnte Armstrong (20) diese Substanz auch ohne vorherige Tryptophan-Belastungen bei der Untersuchung von 1000 Harnproben von Gesunden und Kranken nachweisen. Angaben über die Häufigkeit und Menge fehlen ebenso wie der Hinweis, ob die Substanz vorwiegend bei Gesunden oder Kranken auftritt. Bei der Untersuchung von 20 gesunden jungen Männern und 17 gesunden jungen Frauen konnte Komrower (12) keine N-Acetyltryptophan-Ausscheidung feststellen. Kleinbaum (26) fand bei akuten Ernährungsstörungen im Kindesalter (Dyspepsie) neben anderen Indolen auch eine vermehrte Ausscheidung von N-Acetyltryptophan. Die Höhe der Ausscheidung korreliert mit der Schwere des klinischen Zustandes und verschwindet mit Beginn der Rekonvaleszenz. Bemerkenswert ist, daß bei akuter Dyspepsie ohne cerebrale Beteiligung keine Ausscheidung von N-Acetyltryptophan beobachtet wird. Unter Gabe von Vit. B₆

(bis 150 mg/d) bei Patienten mit Phenylketonurie (PKU) tritt eine bisher nicht erklärbare N-Acetyltryptophanurie auf (27).

Bei einem Patienten mit Urämie konnte Trefz (28) N-Acetyltryptophan mit 1250 mg/l im Plasma nachweisen. In der bereits angeführten umfangreichen Untersuchung von Hartmann (2) spielt das Acetyltryptophan unter den zahlreichen Tryptophan-Metaboliten insofern eine besondere Rolle, als es bei Lebererkrankungen wie chron. Hepatitis, Cirrhose, portaler Hypertension und Shunt-Operationen gegenüber Gesunden seltener und beim Präcoma fast dreimal so häufig vorkommt. Es wurden allerdings keine quantitativen Bestimmungen vorgenommen.

Dieser Tatbestand gab die Anregung, das Auftreten von N-Acetyltryptophan im Harn bei überwiegend mit Hyperammonämie einhergehenden Zuständen von Leberinsuffizienz zu untersuchen und eine quantitative Bestimmung durchzuführen.

A4 Nachweisverfahren

Die klin. Prüfung der Acetyltryptophan-Ausscheidung setzt ein leistungsfähiges analytisches Verfahren

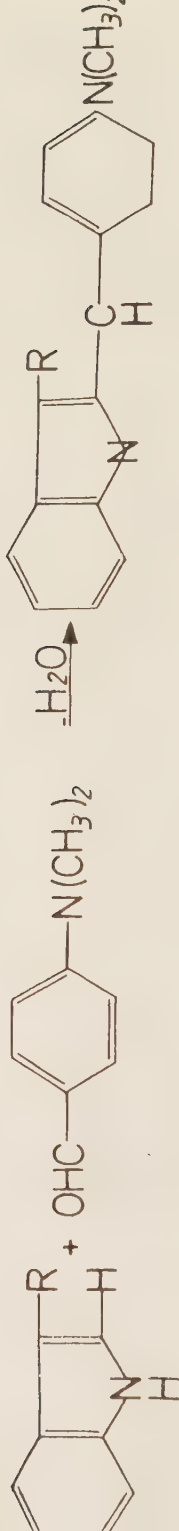
voraus, das auch eine quantitative Auswertung ermöglicht. Diese Voraussetzungen werden von der Dünnschichtchromatographie erfüllt, für die auch ein geeignetes Färbereagens zur Verfügung steht.

Einen Überblick über bisher bei Tryptophan-Metaboliten zur Anwendung gekommene Verfahren gibt Tab. 1. Die zum Acetyltryptophan-Nachweis benutzte, von Ehrlich erstmals beobachtete Farbreaktion, beruht auf einer Kondensation mit p - Dimethylaminobenzaldehyd. Der zugrundeliegende Reaktionsmechanismus geht aus Abb. 1 hervor und erfaßt neben Indolen auch Pyrole und deren Derivate (29).

Analyt. Verfahren zum Nachweis von Trp.-Metaboliten

Verfahren	Literatur	Nachweisgrenze	Vorzüge/Nachteile
Papierchromatographie (GC)	PC und DC wurden von zahlreichen Autoren miteinander verglichen (Schwetlick (30), Pataki (31), Randerath (32), Kaldewey (33), u.a.) Spez. papierchromatogr. Arbeiten (Auswahl): Hartmann (2), Jepson (7), Spince (10), Armstrong (20), Dalgliesh (22), McGeer (27)	ng - 10^{-1} ng (im allgemeinen eine Zehnerpotenz höher im Vergleich zur DC)	Gegenüber DC: Geringer apparativer Aufwand Serienanalysen lassen sich leicht durchführen Höherer Zeitaufwand Geringere Trennschärfe Arbeiten mit aggressiven Reagenzien nicht möglich
Dünnschichtchromatographie (GC)	Allgem. Lit. s.o. Spez. dünnsschichtchromatogr. Arbeiten (Auswahl): Trefz (28), Randerath (32), Diamantstein (37), Opienska-Blauth (35), Kaldewey (33), Del Barba (37)	10^{-1} - 10^{-2} ng (im allgemeinen eine Zehnerpotenz niedriger im Vergleich zur PC)	Gegenüber PC: geringer Zeitaufwand schärferer Trenneffekt b. relativ geringer Steighöhe Die Möglichkeit, Substanzen auch m. aggressiven Reagenzien nachzuweisen Geringer apparativer Aufwand, auch Serienanalysen lassen sich leicht durchführen
Dünnschichtchromatographie (GC)	Allgemeine Literatur: Rylands (36), Trefz (28)	Vergleichbar mit der DC	Zeitaufwand mehrfach geringer als bei der DC Trennschärfe geringer, daher weniger geeignet f.d. Analysen komplexer Lösungen unbekannter Zusammensetzung. Einsatz spez. Färbereagenzien nicht möglich

Nachweisreaktion für Indole

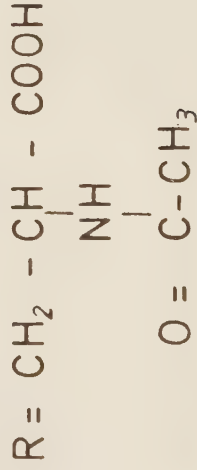


Indol-Derivat

p-Dimethylaminobenzaldehyd

Farbstoff-Komplex

l-Acetyltryptophan:



B Fragestellung und Zielsetzung

Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

1. Entwicklung einer quantitativen Nachweismethode für Acetyl-Tryptophan im Harn ohne Extraktion auf der Basis dünnschichtchromatographischer Arbeitstechniken durch Wahl geeigneter Fließmittel und einer Farbreaktion
2. Aufzeigen der Bedeutung des quantitativen Acetyltryptophan-Nachweises bei hyperammonämischer Leberinsuffizienz und Vergleich mit einem Normalkollektiv.

C Material und Methodik

C1 Krankengut und Kontrollgruppe

Untersucht wurden 31 Harnproben von 25 Patienten, dabei wurden in fünf Fällen Verlaufskontrollen mit bis zu drei Einzelbestimmungen durchgeführt.

Das Alter lag zwischen 33 und 81 Jahren, 17 waren männlich und 8 weiblichen Geschlechts. Im untersuchten Krankengut ist die Lebercirrhose - in 16 Fällen mit unterschiedlich ausgeprägten Zeichen der Dekompensation - 22mal vertreten, darunter drei Patienten nach operativ angelegtem splenorenalen bzw. portocavalen Shunt. Hinzu kommen je ein Fall von Präcoma hepaticum, akuter HB_sAg negativer Hepatitis und Fettleber. Bei 16 Patienten konnte die Diagnose histologisch gesichert werden. Die Kontrolle erstreckt sich auf 25 Harnproben von elf männlichen und 14 weiblichen gesunden Probanden im Alter von zehn bis 49 Jahren.

1.1 Kasuistik

Die untersuchten Fälle mit positivem Acetyl-Tryptophan-Nachweis sind unter Angabe der Diagnose, des

histologischen oder autoptischen Befundes (soweit vorhanden), des Ammoniak-Spiegels im Blut und bereits mit der dazugehörigen N-Acetyl-Tryptophan-Tagesausscheidung versehen in Tabelle 2 zusammengestellt. Über vier Fälle wird ausführlich berichtet.

Casus 1 (M. S., ♀, 58 J.)

Am 3.4. hat die Patientin plötzlich mehrfach Blut erbrochen und Teerstühle abgesetzt. Am Abend des darauffolgenden Tages wurde sie über die Notaufnahme stationär aufgenommen.

Untersuchungsbefund bei der Aufnahme: 58-jährige, vorgealterte gering übergewichtige Patientin in schlechtem AZ, unruhig, grobschlägiger Tremor, Rubeosis faciei, foetor alcoholicus, Spider naevi, Parmarerythem, Beinoedeme.

Leber: 15cm, höckrig, derb

Milz: palpabel

Neurolog. Status: unauffällig.

Path. Laborbefunde bei der Aufnahme (Obere Normgrenze in Klammern): SGOT 60 U/l (18 U/l), SGPT 26 U/L (21 U/l), AP 207 U/l (200 U/l), GLDH 7,4 U/l

(4 U/l), γ -GT 240 U/l (18 U/l), Bili ges. 3,3 mg% (1,2 mg%), Bili dir. 1,3 mg% (0,3 mg%), Quick 45,5%, (untere Grenze 75%), Thrombinzeit 31 sec. (24 sec.), PTT 63 sec. (55 sec.), NH_3 124 μg (65 μg), Elektrophorese (Ges.-Eiw. 7,9 g%): Alb. 47,6 rel., (Norm 55 - 70 rel.), β 30.4 rel. (Norm 12 - 20 rel.).

Bei einer Kontrolle nach zwei Wochen war das Ammoniak noch immer mit 96 μg erhöht. Die Acetyltryptophan-Bestimmung ergab bei zugrundelegen eines mittleren Urinvolumens in 24 Stunden von 1500 ml eine Acetyltryptophan-Ausscheidung von 37.2 mg/d.

Laparoskopisch zeigte sich eine feinknotige Lebercirrhose mit Splenomegalie. Die histolog. Begutachtung bestätigte den Leberbefund.

Es hat sich offensichtlich um eine einmalige nicht vital bedrohende Blutung gehandelt, deren Blutungsquelle auch bei der Notgastroskopie nicht sicher eruierbar war. Es gab zwar einige Hinweise auf Oesophagusvarizen, sie konnten aber weder bei der Gastroskopie noch der MDP eindeutig gesichert werden. Eine Splenoportographie konnte nicht durchgeführt werden, da der Quick trotz Konaktion^R-Gabe keine 60% erreichte und es nach Substitution der Gerinnungsfaktoren zu allergischer Reaktion gekommen war.

Klinisch und histologisch hat sich die Lebercirrhose sichern lassen, die am ehesten alkoholtoxischer Genese ist.

Patholog. Laborbefunde bei Entlassung: Transaminasen unverändert, Quick 50%, zwischenzeitlich auf 29,8% gesunken, Thrombinzeit 25 sec., Gamma-Globuline auf 28,6 rel.% gesunken, NH_3 90%.

Casus 2 (F. S., ♂, 67 J.)

Während des Krieges erkrankte der Pat. an einer Hepatitis. Im Februar war er wegen einer Valium- und Distraneurin-Intoxikation bei bekanntem Alkoholabusus in stat. Krankenhausbehandlung. Seit Mai klagt der Pat. über Schwäche in den Beinen, gelegentlich erhöhter Temperatur sowie über das Auftreten von Hämatomen.

Untersuchungsbefund bei der Aufnahme: Sehr schlechter AZ, starke Unruhe, desorientiert, jedoch voll ansprechbar. Multiple Lymphome in den Ellenbeugen, im Halsbereich, axillär und inguinal. In der Haut ausgeprägte Hämatome, im Bereich des Thorax, Rückens und

der Beine leukämische Infiltrate.

Leber: 14 cm, stark druckempfindlich

Milz: 14 cm, druckschmerzhaft

Patholog. Laborbefunde bei der Aufnahme (Obere Normgrenze in Klammern): BSG 45/80 n.W. (mit Schleier), SGOT 54 U/l (21 U/l), SGPT 55 U/l (33 U/l), AP 384 U/l (200 U/l), γ -GT 113 U/L (28 U/l), Bili ges. 2,4 mg% (1,2 mg%), Bili dir. 2,0 mg% (0,3 mg%), NH_3 263% (80%), Quick 50% (untere Grenze 75%).

Die Sternalpunktion ergab eine massive Knochenmarksinfiltration, im Sinne einer chron.-lymphat. Leukämie. Nach anfänglicher Behandlung mit Leukeran^R geriet der Pat. relativ rasch in ein Lebercoma. Besonders auffällig waren der erneute Anstieg des Ammoniaks - das zwischenzeitlich den Normwert erreicht hatte - auf 178 %, ein exzessiver Anstieg des Bilirubins (Bili ges. 26,6 mg%, Bili dir. 16,0 mg%) und die typischen elektrophoretischen Veränderungen (Alb. 34,4 re.%, $\beta + \gamma$ 56,2 rel.%). Die Acetyltryptophan-Ausscheidung wurde zu diesem Zeitpunkt mit 24,6 mg/d bestimmt. Als weitere Komplikation trat eine cerebrale Ischämie mit linksseitiger Hemiparese auf. An den Folgen dieser Komplikation ist der Pat. letztlich unter Ausbildung einer unbeherrschbaren Pneumonie verstorben.

Casus 3 (E. V., ♂, 64 J.)

Der Patient erkrankte mit 11 Jahren an einer Hepatitis. Vor drei Jahren Auftreten eines Ikterus. Ein Alkoholabusus wird von dem Pat. verneint.

Untersuchungsbefund bei der Aufnahme: 96 kg schwerer, 176 cm großer Pat. mit ausgeprägtem Anasarka und mäßiggradigem Hautikterus. Halsvenenstauung, Aszites und angedeutete "Bauchglatze". Beginnende Teleangiectasien, jedoch keine sicheren Spider naevi, Lackzunge, ausgedehnte Gynäkomastie bds.

Leber: 8 cm, nicht palpabel

Milz: nicht tastbar.

Keine groben neurologischen Ausfälle.

Pathologische Laborwerte bei der Aufnahme (Obere Normgrenze in Klammern):

SGOT 32 U/l (21 U/l), AP 208 U/l (200 U/l), γ -GT 47 U/l (28 U/l), Bili ges. 7,0 mg%, (1,2 mg%), Bili dir. 2,7 mg% (0,3 mg%), Quick 57% (untere Grenze 75%), Serum-Fe 209% (180%), Kreatinin 1,5 mg% (1,4 mg%), Elektrophorese (Ges.-Eiw. 5,7 g%): Alb. 51,5 rel.% (Norm 55 - 70 rel.%), β 27,7 rel.% (Norm 12 - 20 rel.%).

Bei der MDP sind ausgeprägte Oesophagusvarizen nachweisbar. Die Milzszintigraphie bringt eine vergrößerte, homogen speichernde Milz ohne Verdacht auf Speicherdefekte zur Darstellung. Umgerechnet beträgt das Milzgewicht 479 g.

Die chron. Lebererkrankung, die aufgrund der Labor-konstellation einer ausgebrannten Lebercirrhose entspricht, hat in Verbindung mit der Herzinsuffizienz zu einer dramatischen kurzfristigen Wassereinlagerung geführt. Bei der Entlassung ist der Pat. in einem kurfähigen Allgemeinzustand. Auf eine laparoskopische Abklärung wurde verzichtet.

Laborwerte bei der Entlassung (Obere Normgrenze in Klammern): SGOT 27 U/l (21 U/l), γ -GT 37 U/l (28 U/l), Bili ges. 5,4 mg% (1,2 mg%), Bili dir. 2,4 mg% (0,3 mg%), Quick 57% (untere Grenze 75%), NH_3 100% (80%), Elektrophorese (Ges.-Eiw. 5,4 g%): Alb. 44,7 rel.% (Norm 55 - 70 rel.%), γ 33,2 rel.% (Norm 12 - 20 rel.%).

Die Acetyltryptophan-Ausscheidung betrug einen Tag vor der Entlassung - bezogen auf ein mittleres Urinvolumen von 1500 ml (24-Std.-Urin) - 339.9 mg/d.

Vier Tage später erfolgte die Aufnahme in ein Sanatorium. Bei der Aufnahmeuntersuchung im Sanatorium klagt der Patient über Brechreiz, Appetitlosigkeit und starkes Völlegefühl. Bei der klin. Untersuchung fällt der stark reduzierte Kräftezustand des Pat. mit Geldscheinhaut, Hautikterus, Sklerenikterus, hochgradigem Anasarka der Bauchhaut und starkem Oedem der Ober- und Unterschenkel auf. Fein- bis mittelschlägiger Fingertremor. Bauchumfang 98 cm. In der dritten Woche machte sich bei dem Pat. eine zunehmende Schläfrigkeit bemerkbar, er hatte kaum noch Appetit und verweigerte die Flüssigkeitsaufnahme. Der Pat. wurde daraufhin mit hepatischem Praekoma und eingeschränkter Nierenfunktion als Notfall in die Med. Klini nach Mainz überwiesen. Einen Tag später verstarb der Pat. am hepatorenenalen Syndrom.

Casus 4 (J. B., ♂, 69 J.)

Der Pat. wurde am 1.2. ohne anamnestische Hinweise comatös in unsere Klinik eingeliefert. Bei der Untersuchung fand sich ein massiver Aszites bei länger

bekannter Lebercirrhose (Fremdanamnese). Leber und Milz waren nicht abgrenzbar, angedeutete "Bauchglatze". Leichter flapping tremor.

Pathologische Laborbefunde bei der Aufnahme (Obere Normgrenze in Klammern): SGOT 27 U/l (21 U/l), Biliges. 2,7 mg% (1,2 mg%), Bili dir. 0,9 mg% (0,3 mg%), Quick 48% (untere Grenze 75%), NH_3 180 γ % (80 γ %), Elektrophorese (Ges.-Eiw. 6,8 g%): Alb. 50,2 rel.% (Norm 55 - 70 rel.%), γ 33,1 rel.% (Norm 12 - 20 rel.%).

Der Pat. wurde zunächst konservativ mit Aldosteron-Antagonisten und Furosemid behandelt. Die damit erreichte Ausschwemmung war ungenügend, es kam wechselweise zu einem Überwiegen des Meteorismus und des Aszites. Mehrfach traten subileusähnliche Bilder auf, die dann mit Bepanthen^R- und Prostigmin^R-Infusionen beherrscht werden konnten.

Elektrophorese (Ges.-Eiw. 6,3 g%) vom 9.2.: Alb. 45,8 rel.% (Norm 55 - 70 rel.%), α_1 6,0 rel.% (Norm 2 - 5 rel.%), $\beta + \gamma$ 41,8 rel.% (Norm 22 - 35 rel.%).

Die Acetyltryptophan-Ausscheidung betrug zu diesem Zeitpunkt - bezogen auf ein mittleres Urinvolumen von 1500 ml (24-Std.-Urin) - 19,4 mg/d.

Der Ascites nahm weiter zu, es bildete sich ein ausgeprägtes Caput medusae, der Allgemeinzustand des Pat.

verschlechterte sich. Am 16.2. wurden 1000 ml, am 18.2. 1500 ml und am 20.2. 500 ml Aszites punktiert. Hinzu kam ein linksseitiger Pleuraerguß mit zunehmender Herzinsuffizienz und Zeichen der Stauungspneumonie. Der Patient verstarb unter den Zeichen des HerzKreislaufversagens. Bei der Sektion zeigte sich dann die vermutete Pfortaderthrombose bei bestehender klein- bis mittelknotiger Lebercirrhose. Zusätzlich fanden sich multiple maulbeerartige Gallenkonkremente bei chron. Cholecystitis und benachbarten Leberabszessen.

Tab. 2:

Zusammenstellung der untersuchten Fälle mit positivem Acetyltryptophan-Nachweis unter Angabe der Diagnose, des histolog. bzw. autoptischen Befundes, des Ammoniak-Spiegels im Blut, so- wie der 24-Stunden-Ausscheidung von N-Acetyltryptophan.

- 1) NH_3 -Spiegel zum Zeitpunkt der N-Acetyltryptophan-Bestimmung
- 2) vergl. mit den Zahlenangaben in D 2.2

Casus	Initiale, Geschlecht, Alter	Dauer der stat. Be- handlung	Diagnose	Histologie/Autopsie	NH_3	¹⁾ N-Acetyl- Tryptophan
1	M.S., ♀, 58 J.	33 Tage	1. Oesophagusvarizen- blutung bei Leber- cirrhose 2. Alkoholabusus	Feinknotige Leber- cirrhose bei alkohol- toxischer Genese	96%	37.2 mg/d
2	F.S., ♂, 67 J.	19 Tage (verstorb.)	1. Leberinsuff. bei Alkoholabusus 2. Chron.-lymphat. Leukämie 3. Linksseitige Hemiparese	keine Histologie, Sektion wurde ver- weigert	178%	24.6 mg/d

Casus	Initiale, Geschlecht Alter	Dauer der stat. Be- handlung	Diagnose	Histologie/Autopsie	NH ₃ ¹⁾	N-Acetyl- Tryptophan ²⁾
3	E.V., ♂, 64 J.	24 Tage	1. Dekomp. Leber- cirrhose 2. Herzinsuff. 3. Ausgeprägter Aszites, Ana- sarka	Keine Histologie	100%	339.9 mg/d
4	J.B., ♂, 69 J.	22 Tage (verstorb.)	1. Dekomp. Leber- cirrhose 2. Herzinsuff.	Fein- bis mittelkno- tige atrophische Le- bercirrhose (Organge- w.: 1000g), Ikterus d. Leber, sog. "Portale Stauungsmilz"	180%	19.4 mg/d
5	H.S., ♂, 37 J.	53 Tage 41 Tage 15 Tage (verstorb.)	Dekomp. Lebercirrh. Kleinknotige Leber- alkoholtox. Genese cirrh. (wegen gerin- mit portaler Hyper- gen Materials keine tension. Rezidiv. sichere Diagnose massive Oesopha- möglich), Zeichen gusvarizenblutung. der Cholestase		99.6% 143 % 94 %	8.6 mg/d 18.2 mg/d 9.5 mg/d

Fortsetzung Tab. 2

Casus	Initiale, Geschlecht, Alter	Dauer der stat. Behandlung	Diagnose	Histologie/Autopsie	¹⁾ NH ₃	²⁾ N-Acetyl-Tryptophan
6	M.Sch., ♀, 81 J.	5 Tage (verstorb)	Oesophagusvarizenblutung bei ausgeprägter Lebercirrh. (Nachweis durch Splenoporthographie)	Keine Histologie, Sektion wurde verweigert	113%	10.2 mg/d
7	E.B., ♂, 71 J.	32 Tage (verstorb)	1. Verd. auf Lebercirrh. 2. Rechtsherzinsuff. 3. Chron. Bronchit. 4. Anämie unklarer Genese	Keine Histologie, Sektion wurde verweigert	140% 132% 79%	----- ----- 7.8 mg/d
8	E.Be., ♂, 38 J.	16 Tage	1. Dekomp. Lebercirrh. 2. Polyneuropathie	Deutliche Leberparenchymverfettung mit überwiegend periportaler Fibrose, Einzelzellnekrosen	174% 161%	9.4 mg/d 12.0 mg/d
9	P.S., ♂, 50 J.	44 Tage (verstorb)	Alkoholtox. Lebercirrhose mit portaler Hypertension	Keine Histologie	249%	6.6 mg/d

C2 Verwendete Reagenzien, Apparate und deren Hersteller

Äthanol absol. z. Anal.	MERCK Nr. 972
Essigsäureäthylester	MERCK Nr. 9623
Propanol - (2) (iso-Propanol) z. Anal.	MERCK Nr. 9634
Salpetersäure min. 65% (etwa 1.40) z. Anal.	MERCK Nr. 456
Salzsäure rauchend min. 37% (etwa 1.19) z. Anal.	MERCK Nr. 317
N ^a -Acetyl-DL-tryptophan f. biochem. Zwecke	MERCK Nr. 12 423
DL-Tryptophan f. biochem. Zwecke	MERCK Nr. 8404
4-Dimethylaminobenzaldehyd z. Anal.	MERCK Nr. 3058
Urease lyophilisiert 5 U/mg	MERCK Nr. 8489

Entwicklungskammer

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄ 10 x 20 cm	MERCK Nr. 5729
Auftragegerät f. d. Dünnschichtchrom.	MERCK Nr. 10 226
Mikrokapillaren 2 ul f. d. Dünnschichtchrom.	MERCK Nr. 10 290
Universalindikatorstäbchen pH 0 - 14	MERCK Nr. 9535
Fön (Haartrockner)	
Sprüher	
Sprühkabinett (Abzug)	
Densitometer (Chromatogramm-Spektral- Photometer)	Fa. Vitatron TLD 100

C3 Laufmittelgemisch, Sprühreagenzien und Standardlösung

Das verwendete Laufmittel stellt eine Mischung aus Essigsäureäthylester/Isopropanol/Wasser im Verhältnis 50/50/5 (v/v) dar. Von dem Farbreagenz p-Dimethylaminobenzaldehyd werden 1 g in 50 ml Äthanol und der gleichen Menge 37%-iger Salzsäure gelöst und damit die vorher entwickelten Dünnschichtplatten besprüht.

Nach 30 Minuten werden die Dämpfe eines frisch bereiteten Gemischs aus 30 ml ebenfalls 37%-iger Salzsäure und 10 ml 65%-iger Salpetersäure über die Schicht geblasen.

Die Vergleichslösung (Standard) wird durch Auflösen von 10 mg Acetyl-Tryptophan in 100 ml einer Mischung aus Wasser und Isopropanol (Verhältnis 7 : 3) hergestellt. 1 μ l der Standardlösung enthält dann 0.1 ng Acetyl-Tryptophan.

C4 Ursprünglich verwendete Methode

Beim Nachweis von N-Acetyl-Tryptophan im Harn mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (DC) war es bisher immer erforderlich, die Substanz durch einen

Extraktionsvorgang mit einem organischen Lösungsmittel zu isolieren (37). Die Extraktion wurde dabei in einem Scheidetrichter vorgenommen, wobei oft lästige Emulsionen auftraten, die die Schichttrennung erschwerten. Vielfach gelang dies erst durch mehrfache Zentrifugieren. Außerdem mußte dabei immer mit Substanzverlusten gerechnet werden (10, 26, 27).

C5 Optimierungsversuche zur Entwicklung einer Methode wie unter "Zielsetzung" beschrieben

Die Wahl und das Verhältnis der einzelnen Komponenten des Laufmittels haben einen Einfluß nicht nur auf die Nachweisgrenze, sondern auch auf die Qualität der Trennung.

Versuche mit standardisierten Testlösungen und dem Laufmittel 30 g Phenol, 10 ml Isopropanol und 10 ml einer Pufferlösung pH 10 ergaben eine unvollständige Trennung von Tryptophan und N-Acetyl-Tryptophan. Mit dem Laufmittel 50 Vol.% Benzol, 50 Vol.% Propionsäure und 5 Vol.% Aqua dest. war dann eine Differenzierung des Tryptophan- vom N-Acetyl-Tryptophan-Fleck möglich, jedoch nur auf Kosten einer vierfach geringeren

Nachweisgrenze. Auch der Einsatz beider Laufmittel in zwei Entwicklungsgängen nacheinander brachte kein befriedigendes Ergebnis. Es wurde schließlich noch das Benzol in der zuletzt genannten Laufmittelkombination durch Äthanol ersetzt, die gewünschte Nachweisgrenze konnte damit jedoch auch nicht erreicht werden. Die unter C3 genannte Mischung erfüllte schließlich die notwendigen Voraussetzungen eines brauchbaren Laufmittels.

Durch Ansäuern der Harnproben und die Anwesenheit eines org. Lösungsmittels (Isopropanol) konnte die Empfindlichkeit nochmals wesentlich gesteigert werden. Die zum Teil hohen Harnstoffkonzentrationen in den zu untersuchenden Harnen wirken sich störend auf das Laufverhalten des Acetyl-Tryptophans aus und führen zu Fleckdeformationen. Um diese Störung zu beseitigen, wurde der Harnstoff im Harn durch Zugaben von Urease vor der Chromatographie zerstört.

D ErgebnisseD1 Vorschrift zum direkten Nachweis von Acetyl-
Tryptophan im Harn ohne Extraktion

Analysenschnitt	Vorgehen
Harnstoffspaltung	24-Stunden-Urin sammeln - daraus 7 ml in ein Reaktionsgefäß 50 mg Urease zusetzen und 45 Min. stehen lassen
pH-Einstellung	Mit Salzsäure 37% und Indikator- stäbchen auf pH 1 einstellen 3 ml Isopropanol zufügen und 10 Min. bei ca. 4.000 U/min. zentrifugieren
Chromatographie	Es wird abpipettierter Überstand ver- wendet, der mit Mikrokapillaren und dem Auftragegerät MERCK nach dem Schema Abb. 2 auf die DC-Platten aufgetragen wird. Auftragen des Standards in der gleichen Weise. Beim Auftragen mit Fön trocknen, damit möglichst kleine Startpunkte entstehen. Entwickeln der Platten in einer übersättigten Kammer bis zum oberen Rand (ca. 40 min.). Mobile Phase: Essigsäureäthylester/ Isopropanol/H ₂ O 50/50/5 (v/v) Anschließend im Abzug mit Fön trocknen.
Anfärben	1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd in 50 ml Äthanol und 50 ml HCl 37%. Das Sprühreagenz wird mit Hilfe des Sprühgerätes im Abzug (HCl- Dämpfe!) auf die Platte aufgebracht.

Bewertung

Acetyl-Tryptophan erscheint als rotvioletter Fleck. Nach 30 Min. mit Königswasserdämpfen (30 ml HCl 37% und 10 ml HNO_3 65%) die Farbe stabilisieren (jetzt kräftiges Blau); dabei das Saugrohr des Sprühgerätes nicht in das Königswasser eintauchen!

siehe dazu Abb 3, Harn 3

Positiv dann, wenn die Harnprobe in der Laufhöhe (Rf 0.36) und im Farbverhalten mit dem Standard übereinstimmt (mit p-Dimethylaminobenzaldehyd rotvioletter Fleck, der sich nach Berührung mit Königswasserdämpfen in ein kräftiges, bei Zimmertemperatur mehrere Stunden stabiles Blau färbt).

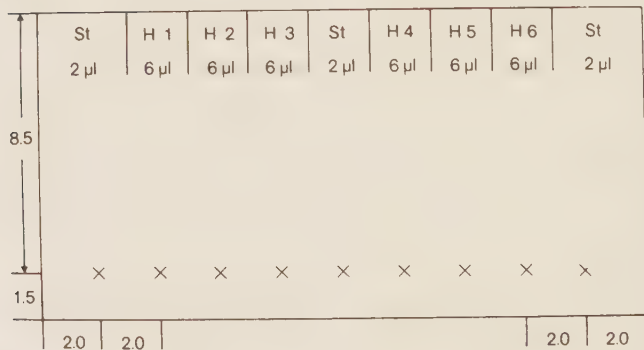


Abb. 2: Auftrageschema für den qualitativen Nachweis

1.1 Halbquantitative Auswertung

N-Acetyltryptophan im Harn Qualitativer Nachweis

St 2µl	Harn 1 6µl	Harn 2 6µl	St 2µl	Trypto 2µl	Harn 3 6µl	Harn 4 6µl	Harn 5 6µl	St 2µl
-----------	---------------	---------------	-----------	---------------	---------------	---------------	---------------	-----------

Abb. 3: Qualitativer Acetyl-Tryptophan-Nachweis (Um die unterschiedlichen Rf-Werte von Tryptophan und Acetyltryptophan zu demonstrieren, wurde an 5. Position eine "Tryptophan-Standardlösung" aufgetragen)

Um eine halbquantitative Abschätzung der Menge an Acetyl-Tryptophan im Harn vornehmen zu können, werden auf einer zweiten DC-Platte von der im Screening-Test positiv erkannten Probe (sh. Abb. 3) mehrmals gleiche Mengen neben einer Reihe steigender Mengen des Standards chromatographiert (sh. Abb. 4).

N-Acetyltryptophan im Harn								
Quantitative Bestimmung								
St 2 μ l	Harn 3 4 μ l	St 4 μ l	Harn 3 4 μ l	St 6 μ l	Harn 3 4 μ l	St 8 μ l	Harn 3 6 μ l	St 10 μ l

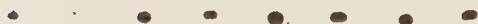


Abb. 4: Quantitativer Acetyl-Tryptophan-Nachweis

Der für den Harn erhaltene Fleck wird in Größe und Intensität einem vergleichbaren Fleck der Standardreihe zugeordnet. Bei der in Abb. 4 wiedergegebenen Bestimmung würde dieser etwa einer Standardmenge von 10 μ l entsprechen (= 1.0 μ g; sh. dazu die Angaben unter C3). Dies bedeutet, daß in 6 μ l Harn 1.0 μ g Ac-Trp= (Acetyl-Tryptophan) enthalten sind.

Unter Anwendung einer einfachen 3-Satz-Rechnung kann die geschätzte Ac-Trp-Menge auf die "Dimension mg/100ml" umgerechnet werden:

$$\begin{aligned}
 6 \mu\text{l Harn} : 1 \mu\text{g Ac-Trp} &= 100 \text{ ml Harn} : x \text{ mg Ac-Trp} \\
 x &= 16.7 \text{ mg Ac-Trp}
 \end{aligned}$$

Bei dieser Berechnung wurde allerdings die unter der Überschrift "Vorschrift zum direkten Nachweis von Acetyl-Tryptophan im Harn ohne Extraktion" angegebene Verdünnung der eingesetzten Harnproben noch nicht berücksichtigt. Der hier zur Anwendung kommende Verdünnungsfaktor d berechnet sich somit - wobei noch ein kleiner Volumenanteil Salzsäure hinzukommt - nach der Beziehung:

$$d = \frac{70 \text{ Vol\% Urin} + 30 \text{ Vol\% Isopropanol} + 3 \text{ Vol\% HCl}}{70 \text{ Vol\% Urin}} = 1.47$$

Somit ist die tatsächliche Acetyl-Tryptophan-Konzentration im Harn in dem aufgeführten Fall mit

$$16.7 \text{ mg/100 ml} \times 1.47 = 24.5 \text{ mg/100 ml}$$

anzugeben.

Die allgemeine Formel lautet demnach:

$$c_{\text{Ac-Trp}}^{\text{real}} = c_{\text{Ac-Trp}}^{\text{Ansatz}} \times \text{Verdünnungsfaktor } d$$

1.2. Quantitative Auswertung

Die in situ-Messung von Dünnschichtchromatogrammen hat in den letzten Jahren durch die entscheidende Weiterentwicklung dafür erforderlicher Geräte stark

an Bedeutung gewonnen. Das Prinzip besteht darin, daß man monochromatisches Licht - unter Verwendung eines Monochromators oder eines geeigneten Filters - auf die Schicht leitet und die durch eine Substanz auf der Schicht verursachte Lichtschwächung mißt. Grundsätzlich sind dabei zwei Verfahren üblich:

1. Transmissionsmessung

Hierbei wird die DC-Platte motorisch an einem Spalt mit einer bestimmten Lichtintensität vorbei bewegt. Das Licht durchstrahlt dabei Schicht und Glasplatte. Dabei wird die durch eine Substanz in der Schicht verursachte Lichtminderung registriert.

2. Remissionsmessung

Hierbei wird ebenfalls eine DC-Platte motorisch an einem Spalt mit einer bestimmten Lichtintensität vorbeibewegt. Gemessen und registriert wird aber in diesem Fall das von der Schicht bzw. das von der Schicht mit Substanz zurückgestrahlte (remittierte) Licht.

Die Registrierung erfolgt in beiden Fällen mit Hilfe eines Schreibers. Abb. 5 zeigt die dabei erhaltenen Peaks einer Acetyl-Tryptophan-Testlösung.

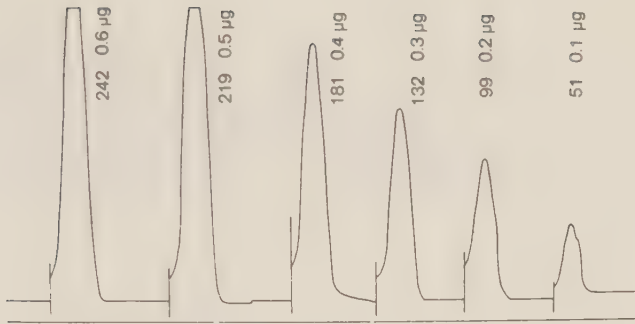


Abb. 5: Registrierte Meßwerte einer Acetyltryptophan-Testlösung (0.1 - 0.6 µg)

Stellt man nun unter Benutzung der in Abb. 5 angegebenen Zahlenwerte eine graphische Beziehung zwischen Substanzmenge und erhaltener Peakfläche her, so ergibt sich ein parabelähnliches Bild (Abb. 6).

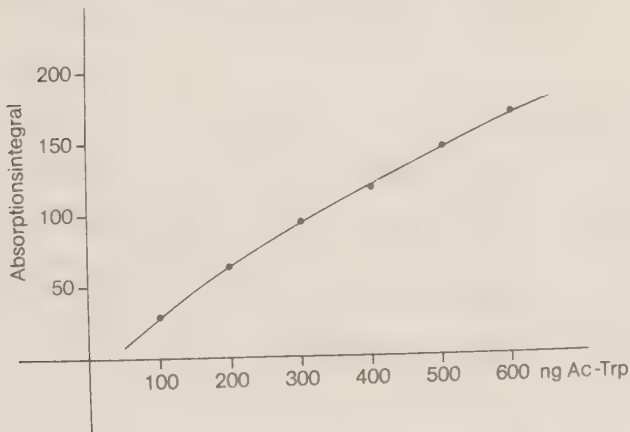


Abb. 6: Darstellung der Abhängigkeit Peakfläche (Absorptionsintegral) von Substanzmenge (ng Acetyl-Tryptophan).

Durch entsprechende Zahlentransformation lässt sich jedoch auch ein lineares Verhältnis zwischen den beiden Größen Substanzmenge und Peakfläche herstellen (Abb. 7).

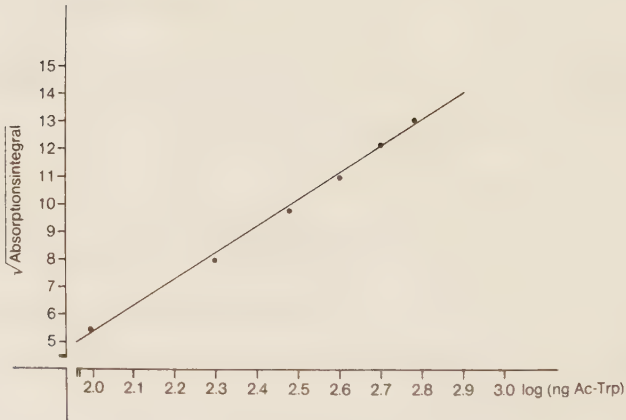


Abb. 7: Darstellung der Abhängigkeit Peakfläche (Absorptionsintegral) von Substanzmenge (ng Acetyl-Tryptophan) nach der Beziehung $\sqrt{\text{Absorptionsintegral}} / \log. \text{ Substanzmenge (ng Acetyl-Tryptophan)}$

b. Durchführung

Bei der in situ-Messung ist zu beachten, daß auf jeder DC-Platte grundsätzlich eine Eichreihe mitgeführt wird, da die Eichgerade für jedes Chromatogramm ein unterschiedliches "Niveau" (Abb. 8) aufweist. Gleichzeitig ist damit eine ständige Kontrolle des durch vielfältige Einflüsse leicht störbaren Systems gegeben.

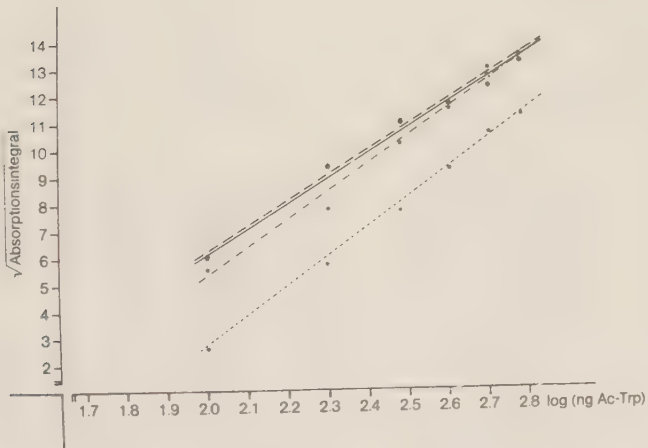


Abb. 8: Vier unterschiedliche Eichkurven verschiedener Chromatogramme

Die Registrierung einer auf diese Weise chromatographierten Harnprobe neben einer Eichreihe ist in Abb. 9 wiedergegeben. Mit dem für die Probe erhaltenen Wert läßt sich dann die entsprechende Konzentration aus der Eichkurve ermitteln.

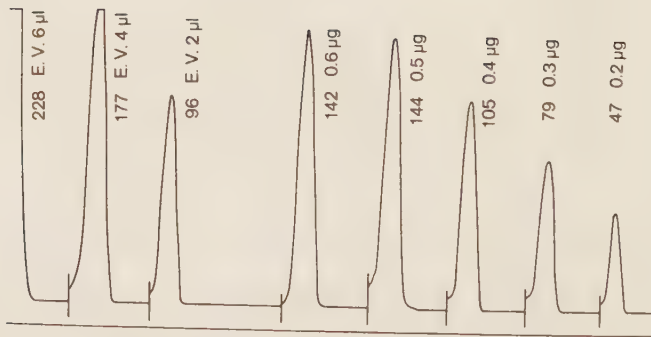


Abb. 9: Registrierte Meßwerte einer Harnprobe neben einer Eichreihe (gemessen bei $\lambda = 500 \text{ nm}$ mit dem Chromatogramm - Spektralphotometer der Firma Vitatron).

D2 Acetyltryptophan-Tagesausscheidung

2.1 Acetyl-Tryptophan-Tagesausscheidung von Gesunden

Unter 25 untersuchten Personen waren zwei mit positivem Acetyl-Tryptophan-Nachweis, das entspricht einer Häufigkeit von 8%.

Erläuterungen zu den beiden nachfolgenden Tabellen:

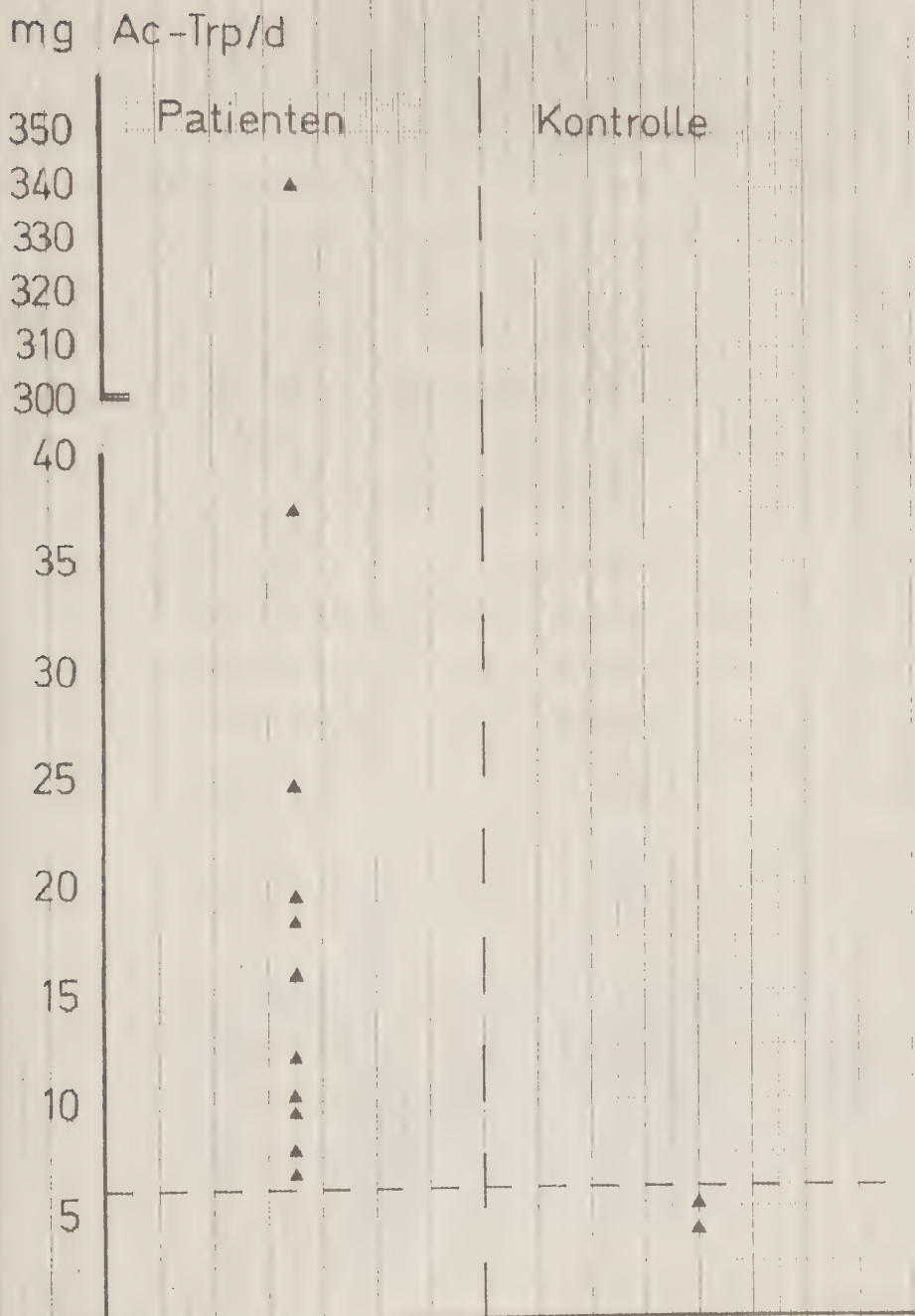
hq = halbquantitative und q = quantitative Bestimmung, $c_{Ac-Trp}^{real} = c_{Ac-Trp}^{Ansatz} \times \text{Verdünnungsfaktor d}$ (vergl. S. 29). Das mittlere Urinvolumen über 24 Std. in Spalte 7 wird mit 1500 ml angenommen. I, II, III hinter den Initialen bedeutet, daß Verlaufskontrollen in bestimmten Zeitabständen durchgeführt wurden.

Initiale	Bestimmung	c_{Ac-Trp}^{Ansatz} (mg/l)	c_{Ac-Trp}^{real} (mg/l)	Menge 24- Std.-Urin (ml)	Tages-Aus- scheidung Ac- Trp (mg/d)	Tages-Aus- scheidung Ac- Trp	mittl. Urin- volumen über 24 Std. (mg/d)
C.S.	hq	1.8	2.6	---	---	3.9	
G.H.	hq	2.4	3.5	---	---	5.2	

2.2 Acetyl-Tryptophan-Tagesausscheidung von Kranken

H.S. I	q	3.9	5.7	---	---	8.6	
H.S. II	q	3.5	5.1	3600	18.2	---	
H.S. III	q	4.8	7.0	1350	9.5	---	

Initiale	Bestimmung	c _{Ac-Trp} Ansatz (mg/l)	c _{Ac-Trp} real (mg/l)	Menge 24- Std.-Urin (ml)	Tages-Aus- scheidung Ac- Trp (mg/d)	Tages-Aus- scheidung Ac- Trp mittl. Urin- volumen über 24 Std. (mg/d)
E.Be. I	q	4.3	6.3	---	---	9.4
E.Be. II	q	5.4	8.0	---	---	12.0
E.B.	hq	3.6	5.2	740	3.9	7.8
E.V.	q	181.4	266.6	630	168.0	339.9
M.S.	q	16.9	24.4	400	9.9	37.2
F.S.	q ;	12.0	17.7	1390	24.6	---
M.Sch.	q	4.6	6.8	690	4.7	10.2
J.B.	q	8.8	12.9	720	9.3	19.4
P.S.	hq	3.0	4.4	420	1.8	6.6



Graphische Gegenüberstellung Patientengruppe/Kontrolle
basierend auf den Wertetabellen D 2.1 und 2.2

Tab. 3: Vorkommen von N-Ac-Trp im Urin bei Normalpersonen und einzelnen Krankheitsgruppen

	Anzahl der untersuchten Fälle	Fälle mit pos. Ac-Trp- Nachweis absolut prozentual	Ac-Trp-Ausscheidung (mg/d)
Normalpersonen	25	2 8%	4 - 5
Fettleber	1	0 0%	-
Akute Hepatitis	1	0 0%	-
Lebercirrhose	6	2 33%	12 - 25
Dekomp. Leber- cirrh. (port. Hypertension)	13	7 54%	7 - 37 (340)
Shunt-Op	3	0 0%	-
Präcoma	1	0 0%	-

E. Diskussion

E1 Kritik der eigenen Methode und Vorteile gegenüber anderen Verfahren

Bei alleiniger Berücksichtigung der Farbreaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd erreicht die Methode keine sehr große, durch die Farbunterschiede in Verbindung mit der DC-Trennung insgesamt jedoch ein hohes Maß an Spezifität.

Im Vergleich zu anderen Verfahren konnte eine wesentliche Vereinfachung durch Umgehung des Extraktions-schrittes erreicht werden. Die in situ-Quantifizierung mit dem Spectralphotometer kann in einzelnen Fällen - im eigenen Untersuchungsgut bei vier von 14 positiven Harnproben - wegen zu kleiner Farbzonen, störender Begleitzonen oder starker Deformierung der Farbbezirke nicht durchführbar sein.

E2 Bedeutung der Bestimmung der Tagesausscheidung in der Diagnostik (Prognosen) bei Leberinsuffizienz

Von neun Patienten, bei denen eine gegenüber Gesunden erhöhte Acetyl-Tryptophan-Ausscheidung nachgewiesen

wurde, verstarben sechs innerhalb eines Zeitraumes von fünf Tagen und sechs Wochen an den mittel- oder unmittelbaren Folgen ihrer fortgeschrittenen Lebererkrankung. Lediglich ein Patient überlebte insgesamt sieben Monate, wohl aufgrund seines geringen Alters (37 Jahre). Bei ihm konnte dreimal mäßiggradig erhöht Acetyl-Tryptophan nachgewiesen werden. Eine erhöhte Acetyl-Tryptophan-Ausscheidung muß demnach bei an Leberinsuffizienz erkrankten als prognostisch ungünstiges Zeichen - 78% Sterblichkeit innerhalb kurzer Zeit - gewertet werden.

F Schlußfolgerungen

Nach der heutigen Auffassung ist neben dem Ammoniak die Imbalanz zwischen Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Methionin - neben einigen anderen Aminosäuren - und verzweigtkettigen Aminosäuren (Isoleucin, Leucin, Valin) ein gewichtiger pathogenetischer Faktor bei dem Entstehen der hepatischen Encephalopathie (46,47,48,49,50). Zu dem Abfall der verzweigtkettigen Aminosäuren kommt es durch Hyperinsulinämie und Verstoffwechselung im Muskel. Der Anstieg der aromatischen Aminosäuren spricht für

eine Abnahme des Insulin/Glucagon-Quotienten (51). Eine das Aminosäuregleichgewicht wieder herstellende Infusionsbehandlung mit Lösungen, die reichlich verzweigtkettigte Aminosäuren und wenig Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Methionin enthalten, führt zur deutlichen Besserung einer bestehenden Encephalopathie und verhindert bei gefährdeten Patienten ihre Entstehung (52,53,54). Diese Ergebnisse wurden auch im Tierversuch bestätigt (55,56). Auch die Tatsache, daß N-Acetyltryptophan nur bei akuter Dyspepsie mit cerebraler Beteiligung und nicht auch bei Fällen ohne ZNS-Beteiligung ausgeschieden wird, unterstreicht dies (vergl. S. 6). Die Aminosäure-imbalance führt nach Ansicht einiger Autoren (48,52, 57) zu einer gestörten Neurotransmitterfunktion. Knauff (58) sieht die Rolle des Ammoniaks weniger in einer direkten Wirkung als vielmehr in der Verschiebung der Relation wichtiger Aminosäuren. In Zusammenarbeit mit anderen toxischen Spaltprodukten des Aminosäurestoffwechsels, wie Indol, Skatol, Phenol, Kresole, Thyamin, Histamin, Putrescin u.a. senkt Ammoniak auch die cerebrale Oxydationsrate oder hemmt die Decarboxylierung wichtiger Aminosäuren.

Die Folge ist ein cerebraler Katecholaminmangel (58,59). Eine verminderte kompetetive Wirkung verzweigtkettiger Aminosäuren führt zu einer vermehrten Aufnahme von Tryptophan in das Gehirn (57). Die Folge ist eine exzessive Serotoninbildung, die für die Entstehung des hepatischen Komas mit verantwortlich ist (60).

G Zusammenfassung

Unter Anwendung der eindimensionalen Dünnschichtchromatographie wurden 25 Harnproben von Gesunden und die gleiche Anzahl von Patienten mit Leberinsuffizienz auf das Vorkommen von N-Acetyltryptophan untersucht. Bei den Lebererkrankungen handelt es sich in 13 Fällen um decomp. Cirrhusen, in 6 Fällen um Cirrhusen, in 3 Fällen um Patienten nach Shunt-Operationen und um je einen Patienten mit Präcoma hepaticum, akuter Hepatitis und Fettleber. Eine Ausscheidung von N-Acetyltryptophan wurde mit 4 - 5 mg/d und einer Häufigkeit von 8% bei gesunden Probanden, mit 7 - 37 mg/d - in einem Fall bis 340 mg/d - und einer Häufigkeit von 54% bei decomp. Cirrhusen und mit 12 - 25 mg/d und einer Häufigkeit von 33% bei Cirrhusen nachgewiesen.

In Analogie zu anderen Störungen des Aminosäurenstoffwechsels bei Leberinsuffizienz (53), sind folgende Aussagen möglich:

- 1) Infolge des blockierten Abbaus - hoher Tryptophan-Spiegel im Serum - und eines abnormen Abbauweges tritt Acetyltryptophan vermehrt auf, was für die Leberinsuffizienz ursächlich bedeutsam sein könnte.

- 2) Ein atypischer Stoffwechselweg, der beim Gesunden nur eine geringe Durchsatzrate aufweist, wird offensichtlich vermehrt durchlaufen.
- 3) Bei Leberinsuffizienz ist die Fähigkeit der Leber, den Plasmaspiegel einzelner Aminosäuren zu regulieren, aufgehoben. Das Auftreten von N-Acetyltryptophan im Harn ist Ausdruck dieser Dysregulation.

H. Literatur

1. E. Buddecke: Grundriß der Biochemie
2. Auflage (1971), De Gruyter Berlin
2. F. Hartmann, E. Freiberg und W. Ruge: Indolmuster
im Urin Leberkranker
Klin. Wschr. 40 (1961), 721
3. G.G. Brune, R.M. Brune und A. Wiskemann: Tryptophan-
stoffwechsel bei Kranken mit Pellagra
Arch. Derm. Forsch. 240 (1971), 44
4. P. Karlson: Kurzes Lehrbuch der Biochemie
8. Auflage (1972), G. Thieme, Stuttgart
5. A.Y. Tourian, J.B. Sidbury: Phenylketonurie. In:
The metabolic basis of inherited disease (J.B.
Stanbury, J.B. Wyngaarden, D.S. Fredrickson, edit.)
New York-Toronto-London: Mc Graw-Hill Book Company
1960
6. H.J. Rylance: The estimation of indoxyl sulphate in
urine
Clin. Chim. Acta 26 (1969), 99
7. J.B. Jepson: Paper chromatography of urinary indoles
Lancet 269 II (1955), 1009

8. D. N. Baron, C.E. Dent, H. Harris, E.W. Hart, and J.B. Jepson: Hereditary pellagra-like skin rash with temporary cerebellar ataxia. Constant renal-amino-aciduria. And other bizarre biochemical features
Lancet 271 I (1956), 421
9. J.B. Jepson: Indolylacetyl-Glutamine and other indole metabolites in Hartnup disease
Biochem. J. 64 (1956), 14 P
10. H. Sprince, C. Parker, J.T. Jr. Dawson, D. Jameson, and F.C. Dohen: Paper chromatography of urinary indoles extractet under alkaline and acid conditions
J. Chromatog. 8 (1962), 457
11. B. Haverback jr., A. Sjoerdsma, and L.L. Terry: Urinary exretion of the serotonin metabolite 5-hydroxy-indolacetic acid in various clinical conditions
News Engl. J. Med. 255 (1956), 270
12. G.M. Komrower, V. Wilson, J.R. Clamp, and R.G. Westall: Hydroxykynureninuria
Arch. Dis. Childh. 39 (1964), 250
13. D.P. Rose: Aspects of tryptophan metabolism in health and desease: a review
J. clin. Path. 25 (1972), 17
14. K. Tada, H. Ito, Y. Wada, and T. Arakawa: Congenital tryptophanuria with dwarfism
Tohoku J. Exper. Med. 80 (1963), 118

15. V. Grosser, A. Knapp, G. Wolfram, U. Grimm und H. Lubs:
Tryptophanbelastung unter Nahrungskarenz
Dtsch. Ges.wesen 28 (1973), 793
16. K. Knapp, G. Wolfram und W. Posch: Chronische
Urtikaria und Vitamin-B₆-abhängige Störungen im
Tryptophanstoffwechsel
Derm. Mschr. 156 (1970), 175
17. V. Patt und H. Feltkamp: Hormonale Kontrazeption,
Tryptophanstoffwechsel und Depression
Arch. Gynäk. 219 (1975), 49
18. K. Altmann and o. Greengard: Correlation of
kynurenine excretion with liver tryptophan pyrrolase
levels in disease and after hydrocortisone induction
J. clin. Invest. 45 (1966), 1527
19. W. Kochen und K. Hochberg: Untersuchungen über den
Tryptophan-Stoffwechsel beim Blasen-Carcinom
Z. Krebsforsch. 73 (1970), 251
20. M.D. Armstrong, K.N.F. Shaw, M.J. Gortatowski and
H. Singer: The indole acids of human urine. Paper
chromatography of indole acids
J. Biol. Chem. 232 (1958), 17
21. W. Prellwitz: Klinisch- chemische Diagnostik
1. Auflage (1972), G. Thieme, Stuttgart

22. C.E. Dalglish: Two-dimensional paper chromatography of urinary indoles and related substances
Biochem. J. 64 (1956), 481
23. L. Musajo and C.A. Benassi: Aspects of disorders of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in man
Advan. Clin. Chem 7 (1964), 63
24. E. Boyland and D.C. Williams: The Metabolism of Tryptophan
Biochem. J. 64 (1956), 578
25. R.R. Langner, and C.P. Berg: Metabolism of D-Trp. in the normal human subject
J. Biol. Chem. 214 (1955), 699
26. H. Kleinbaum: The excretion of indole bodies in the urine of infants with dietary disturbances
Chem. Abstr. 52 (1958), 4809
27. E.G. Mc Geer and B. Tischler: Vitamin B₆ and mental deficiency. The effects of large doses of vitamin B₆ (pyridoxine) in phenylketonuria
Chem. Abstr. 53 (1959), 10419
28. F.K. Trafz, D.J. Byrd und W. Kochen: Kombinierte Anwendung der mikropräparativen Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie und der Dünnschichtchromatographie beim Nachweis von Indolmetaboliten im menschlichen Plasma
J. Clin. Chem. Clin. Biochemie 14 (1976), 65

29. R. Clotten und A. Clotten: Hochspannungselektrophorese 1962, G. Thieme, Stuttgart
30. Autorenkollektiv (K. Schwetlick): Organikum 13. Auflage (1974), VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin
31. G. Pataki: Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie, 1966, Walter de Gruyter, Berlin
32. K. Randerath: Dünnschicht-Chromatographie 2. Auflage (1972), Verlag Chemie Weinheim/Bergstraße
33. H. Kaldewey: "Einfache" Indolderivate und pflanzliche Wachstumsregulatoren. In: Dünnschicht-Chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch, hrsg. von E. Stahl, 2. Auflage (1967), Springer-Verlag Berlin
34. T. Diamantstein und H. Ehrhart: Dünnschichtchromatographische Trennung einiger Stoffwechselprodukte des Tryptophan
Z. physiol. Chemie 326 (1961), 131
35. J. Opieska-Blauth, H. Kraczkowski, Brzuszkiewicz und Z. Zagörski: The adaptation of a modified Adamkiewicz-Hopkins Test to the detection of indole compounds and the quantitative determination of tryptophan by TLC
J. Chromatog. 17, (1965), 288

36. H.J. Rylance: The estimation of indoxyl sulphate in urine Clin. Chim Acta 26 (1969), 99
37. F. Del. Barba, H. Wimmer und A. Rösler-Engelhardt: Indolderivate im Harn.
In: Akute Syndrome, hrsg. von A. Engelhard und H. Lommel,
Verlag Chemie GmbH, D-6940 Weinheim, 1978
38. J. Chotte, M. Chetaille, F. Poulet et J. Christiansen: Méthode de séparation chromatographique bidimensionnelle sur couche mince des métabolites du tryptophane
J. Chromatog. 19 (1965), 312
39. M.D. Armstrong, K.N.F. Shaw and P.E. Wall: The phenolic acids of human urine. Paper chromatography of phenolic acids
J. Biol. Chem. 218 (1956), 293
40. E. Stahl: Dünnschicht-Chromatographie, IV. Mitteilung: Einsatzschema, Randeffekt, "saure und basische" Schichten, Stufentechnik
Arch. Pharm. 292 (1959), 411
41. H. Gänshirt: Quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen. In: Dünnschicht-Chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch, hrsg. von E. Stahl, 2. Auflage (1967), Springer-Verlag Berlin
42. R. Klaus: Einige kritische Betrachtungen zur photometrischen Auswertung von Dünnschichtplatten
J. Chromatog. 16 (1964), 311

43. E. Stahl: Sorptionsmittel zur DC. In: Dünnschicht-chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch, hrsg. von E. Stahl, 2. Auflage (1967), Springer-Verlag Berlin.
44. E. Stahl: Geräte und allgemeine Techniken der DC. In: Dünnschicht-Chromatographie, Ein Laboratoriumshandbuch, hrsg. von E. Stahl, 2. Auflage (1967), Springer-Verlag Berlin
45. H. Nieth: Doppelseitige Erkrankungen der Niere. In: Lehrbuch der Inneren Medizin, hrsg. von R. Gross, P. Schölmerich 3. Auflage Stuttgart 1973
46. J.E. Fisher, N. Yoshimura, A. Aguirre, J.H. James, M.G. Cummings, R.M. Abel and F. Deindoerfer: Plasma Amino acids in Patients with Hepatic Encephalopathy. Effect of Amino Acid Infusion Amer. J. Surg. 127 (1974), 40
47. J.E. Fisher, H.M. Rosen, A.M. Ebeid, J.H. James, J.M. Keane, and P.B. Soeters: The effect of Normalization of Plasma Amino Acids on Hepatic Encephalopathy in Man. Surg. 80 (1976), 77
48. J.E. Fisher: Hepatic Coma in Cirrhosis Portal Hypertension and Following Portacaval Shunt Arch. Surg. 108 (1974), 325
49. W. Gerok: Quantitative Bestimmung der Aminosäuren im Serum bei Erkrankungen der Leber Dtsch. med. Wschr. 23 (1963), 1188

50. E. Ham, J.P. Striebel, R. Minzenmaier, and
R. Kattermann: Pathogenese der hepatischen Enze-
phalopathie
Leber-Magen-Darm 7 (1977), 241
51. P.B. Soeters and J.E. Fisher: Insulin, Glucagon,
Aminoacid Imbalance and Hepatic Encephalopathy
Lancet, Oct. 23 (1976), 880
52. J.E. Fisher, J.M. Funovics, A. Aguirre, J.H. James,
J.M. Keane, R.I.C. Wesdorp, M. Yoshimura, and
T. Westman: The Role of Plasma Amino Acids in
Hepatic Encephalopathy Surg. 78 (1975), 276
53. H.M. Rosen, N. Yoshimura, J.M. Hodgman and J.E.
Fisher: Plasma Amino Acid Patterns in Hepatic
Encephalopathy of Differing Etiology
Gastroenterology 72 (1977), 483
54. P. Jerenci, J.M. Funovics and F. Wewalka: Versuche
zur parenteralen Ernährung dekompensierter Zirrhosen
Klin. Anästh. u. Intensivtherapie Band 13,
Springer-Verlag
55. R.E. Condom: Effect of Dietary Protein on Symptoms
and Survival in Dogs with an Eck-Fistula
Amer. J. Surg. 121 (1971), 107
56. J.M. Funovics: Grundlagen für die Anwendung von
Aminosäuren im Coma hepaticum
Klin. Anästh. u. Intensivtherapie Band 13,
Springer-Verlag

57. H.N. Munro, J.D. Fernstrom an R.J. Wurtman:
Insulin, Plasma Aminoacid Imbalance and Hepatic
Coma
Lancet, March 29 (1975), 722

58. H.G. Knauf: Der Aminosäurenstoffwechsel bei den
Enzephalopathien (unter besonderer Berücksichtigung
des Leberkomas)
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 72 (1967) 156

59. J.M. Funovics: Die zerebrale Manifestation im
Syndrom des Koma hepaticum
Wien. klin. Wschr. 87 (1975) Suppl. 36

60. O. Record, B. Bucton, R.A. Chase and G. Curzon:
Plasma and Brain Amino Acids in Fulminant Hepatic
Failure and their Relationship to Hepatic Ence-
phalopathy
Europ. J. clin. Invest. 6 (1976), 387

61. W. Gerok: Aminosäurenstoffwechsel bei Leberin-
suffizienz
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 75 (1969), 33

LEBENS LAUF

Am 06. August 1950 in Dirmstein/Pfalz geboren.

Vater: Georg Melzer, Landwirt.

Mutter: Elisabeth Melzer, geborene Lichti, Hausfrau.

April 1957 - März 1962: Besuch der Volksschule in
Dirmstein.

April 1962 - Mai 1971: Staatliches Gymnasium in
Frankenthal besucht, am 17. Mai
1971 die Reifeprüfung abgelegt (Mathematisch-Naturwissen-
schaftlicher Zweig).

15. Oktober 1971 - April 1978 Studium der Medizin an der
Johannes-Gutenberg-Universität in Mainz.

Seit 15. Oktober 1976 mit der Krankengymnastin
Claudia Melzer, geborene Schacht, verheiratet.

Ärztliche Prüfung am 27. April 1978.

Chirurgische Assistentenzeit im Krankenhaus Paulinstift
in Wiesbaden, zunächst unter Dr. R. Barthel, dann unter
Prof. R. Loth.

Seit 1. August 1980 als Assistenzarzt bei Prof. H.J.
Refior in der Orthopädischen Klinik der Medizinischen
Hochschule Hannover tätig.

Mein Dank gilt den Herren Professoren
Dr. K. H. Holter-Müller und Dr. K. Ewe
für die freundliche Übernahme der Gutachten.

